UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES

PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

CÂMPUS ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MAIARA CRISTINA SECCO

EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTO DE MIRTILO (*VACCINIUM* SP) EMPREGANDO LÍQUIDOS PRESSURIZADOS

ERECHIM-RS

2018

MAIARA CRISTINA SECCO

EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTO DE MIRTILO (*VACCINUIM* SP) EMPREGANDO LÍQUIDOS PRESSURIZADOS

Dissertação apresentada como requisito parcial na obtenção do grau de mestre, pelo curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Câmpus de Erechim.

Orientadores: Alexander Junges e Natalia Paroul.

ERECHIM-RS

2018

MAIARA CRISTINA SECCO

EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTO DE MIRTILO (*VACCINIUM* SP) EMPREGANDO LÍQUIDOS PRESSURIZADOS

Dissertação apresentada como requisito parcial na obtenção do grau de mestre, pelo curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões – Campus de Erechim.

Erechim, 27 de Abril de 2018.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Alexander Junges (Orientador)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

_____

Prof. Drª. Natalia Paroul (Orientadora)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

_____

Prof. Dr. Rogério Cansian

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

_____

Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo

Instituto Federal do Rio Grande do Sul – IFRS Erechim

ERECHIM-RS

2018

Dedico este trabalho aos meus pais Nair e Ivaldino, por sempre acreditarem em mim e na minha capacidade de realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de meu esforço e de outras pessoas que estiveram ao meu lado nesta caminhada e me ajudaram a superar os obstáculos, sem estas pessoas este trabalho não se realizaria.

Agradeço a minha família pelo apoio e compreensão, por todo amor e carinho dedicado a mim, sempre me lembrando de que são meu alicerce, minhas raízes e dando sentido a palavra lar.

Meus orientadores Natalia Paroul e Alexander Junges, sempre disponíveis e dispostos a ajudar, compartilhando seus conhecimentos e me incentivando.

Aos professores que dividiram seu conhecimento e incentivaram os estudos ao longo da caminhada.

A Ilizandra Aparecida Fernandes pela ajuda, esclarecimentos e contribuições, que muito fizeram a acrescentar neste trabalho.

Aos colegas, Anne, Karine, Letícia, Naíra, Jean e Amanda, pela ajuda nos laboratórios e horas de descontração, onde juntos somávamos os ânimos, as esperanças e trocávamos opiniões.

Aos prestativos funcionários da URI que sempre buscaram ajudar e atender com eficiência.

A CAPES pela concessão de bolsa, que fez-se necessária para a realização do mestrado.

A todos aqueles que mesmo com uma breve passagem deixaram um pouco de si registrado para meu crescimento durante este período.

Ao universo, que com sua magnífica força nos faz crescer quando achamos que as forças estão esgotadas, que mesmo diante de enormes barreiras nos faz encontrar soluções e assim descobrir o caminho, pois além das horas dedicadas escrevendo, estudando, pesquisando, fazendo análises, a beleza da vida se destaca e mostra o quanto é maravilhosa.

Meu muito obrigada!

RESUMO

O mirtilo é ainda pouco conhecido no Brasil, por ser sazonal diversos produtos são desenvolvidos a sua base. O suco de mirtilo gera um subproduto, também chamado de bagaço, sendo este formado pela pele e semente, este subproduto contém quantidades significativas de compostos bioativos que podem ser aproveitados. A extração pela técnica PLE (Pressurized Liquid Extraction) tem-se destacado para extração de compostos que são termolábeis, como os fenólicos, utilizando elevadas pressões e temperaturas mais brandas. Este trabalho teve por objetivo a obtenção de extratos contendo antioxidantes, como compostos fenólicos e antocianinas, a partir do subproduto gerado na fabricação do suco de mirtilo, através da utilização da extração com líquido pressurizado PLE. Os solventes empregados para extração de compostos devem ser seletivos e vantajosos para o processo. Testou-se 4 diferentes solventes e cada um em dois pH diferentes através da técnica PLE. O extrato que obteve maior teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante com IC_{50} de 11 mg/mL, foi o solvente propilenoglicol 20% em solução aquosa. Quando foram utilizadas condições similares para comparação de técnicas de extração com o mesmo solvente, obteve-se uma quantidade de compostos fenólicos de 968,33±8,77 mgEAG/100g por maceração enquanto por PLE foram extraídos 4116,62±23,65 mgEAG/100g. Desta forma o extrato de subproduto de mirtilo obtido por PLE mostrou-se uma interessante fonte de compostos que apresentam atividade antioxidante, além de quantidades significativas de compostos de cor, antocianinas, podendo ser uma alternativa ao uso de aditivo natural.

Palavras-chave: mirtilo, antioxidantes, antocianinas, extração com líquidos pressurizados.

ABSTRACT

Blueberry is still little known in Brazil, because it is seasonal several products are developed at its base. Blueberry juice generates a by-product, also called bagasse, which is formed by skin and seed, this by-product contains significant amounts of bioactive compounds that can be harnessed. Extraction by the PLE technique (Pressurized Liquid Extraction) has been highlighted for extraction of compounds that are thermolabile, like phenolics, using high pressures and milder temperatures. The objective of this work was to obtain extracts containing antioxidants, such as phenolic compounds and anthocyanins, from the by - product generated in the manufacture of blueberry juice, through the use of PLE pressurized liquid extraction. The solvents used for extraction of compounds should be selective and advantageous for the process by testing 4 different solvents and each at two different pHs using the PLE technique, the extract that obtained the highest content of phenolic compounds and antioxidant capacity with IC_{50} of 11 mg/mL, the solvent was propylene glycol 20% in aqueous solution. When similar conditions were used for comparison of extraction techniques with the same solvent, a quantity of phenolic compounds of 968.33±8.77 mgEAG /100 g per maceration was obtained while by PLE 4116.62±23.65 mgEAG/100g. In this way the extract of blueberry by-product obtained by PLE proved to be an interesting source of compounds that present antioxidant activity, besides significant amounts of color compounds, anthocyanins, being an alternative to the use of natural additive.

Keywords: blueberry, antioxidants, anthocyanins, extraction with pressurized liquids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Imagem de mirtilo (*Vaccinium* sp). 16
Figura 2- Estrutura básica dos compostos fenólicos. 20
Figura 3- Mecanismo de ação dos antioxidantes primários. 22
Figura 4- Estrutura química dos flavonoides. 22
Figura 5- Estrutura do cátion flavílico. 23
Figura 6- Estrutura química básica de uma antocianina. 24
Figura 7- Curva de cinética de extração com suas etapas: taxa de extração constante (CER); taxa de extração decrescente (FER); período difusional (DC). 27
Figura 8- Bagaço de mirtilo. 29
Figura 9- Bagaço de mirtilo após liofilização. 29
Figura 10- Unidade de extração PLE. 31
Figura 11- Curvas das cinéticas de extração. 36
Figura 12- Compostos fenólicos extraídos a cada 30 minutos. 38
Figura 13- Quantidade total de compostos fenólicos extraídos. 39
Figura 14- Teor total de antocianinas monoméricas extraídas a cada 30 minutos. 40
Figura 15- Quantidade total de antocianinas monoméricas. 41
Figura 16- Antocianinas extraídas por maceração. 43
Figura 17- Compostos fenólicos extraídos por maceração. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil nutricional do mirtilo. 18
Tabela 2- Classificação dos compostos fenólicos em plantas. 21
Tabela 3- Nomes e grupos substituintes R1 e R2 das principais antocianidinas encontradas na natureza e sua respectiva coloração. 24
Tabela 4- Resultados das análises das propriedades da matéria-prima. 35
Tabela 5- Rendimento total de cada solvente. 37
Tabela 6- Valores de IC_{50} obtidos de cada extrato. 42
Tabela 7- Comparação entre extração por maceração e PLE. 44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 OBJETIVOS 14
2.1 Objetivo geral 14
2.2 Objetivos específicos 14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
3.1 Mirtilo 15
3.1.3 Aspectos econômicos 16
3.1.4 Composição e valor nutricional 17
3.2 Resíduos da indústria alimentícia 19
3.3 Compostos fenólicos 20
3.3.1 Flavonoides 22
3.3.1.1 Antocianinas 23
3.4 Extração de compostos bioativos de resíduos vegetais 25
3.4.1 Extração por maceração 26
3.4.2 Extração com líquido pressurizado (PLE) 26
3.4.3 Cinética de extração 27
4 MATERIAIS E MÉTODOS 29
4.1 Material 29
4.1.1 Obtenção e preparo da matéria-prima 29
4.1.2 Reagentes 30
4.2 Metodologia experimental 30
4.2.1 Análise das propriedades da matéria-prima 30
4.2.2 Extração com líquido pressurizado 30
4.2.2.1 Unidade de extração 30
4.2.2.2 Condições de extração 31
4.2.3 Extração por maceração 32
4.2.4 Determinação do rendimento global e cinética de extração 32
4.2.5 Teor total de antocianinas monoméricas 33
4.2.6 Compostos fenólicos totais 33
4.2.7 Atividade antioxidante 34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
5.1 Análises das propriedades da matéria-prima 35
5.2 Extração com líquido pressurizado 35

5.2.1 Cinéticas de extração 35
5.2.2 Compostos fenólicos totais 38
5.2.3 Teor total de antocianinas monoméricas 39
5.2.4 Atividade antioxidante 42
5.3 Extração por maceração 43
6 CONCLUSÃO 46
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 47
REFERÊNCIAS 48

1 INTRODUÇÃO

O mirtilo (*Vaccinium* sp) é uma pequena fruta originaria da América do Norte e Europa que foi introduzido no Brasil por volta da década de 80. Ainda pouco consumido e cultivado pelos brasileiros, mas suas propriedades benéficas, cada vez mais, estão chamando a atenção da comunidade científica (FACHINELLO, 2008; SARKIS et al., 2013). Em sua composição existe quantidade elevada de compostos bioativos que possuem ação de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica, sendo também conhecido como a fruta da longevidade (WANG; CAMP; EHLENFELDT, 2012).

Por se tratar de uma fruta sazonal, grande quantidade de mirtilo é processada, assim gerando resíduos do processo. Na indústria de sucos gera-se o bagaço de mirtilo, composto pela pele e sementes. Sem destinação adequada este resíduo acaba sendo enviado para compostagem ou alimentação animal. No entanto, muitos compostos de interesse permanecem retidos no bagaço (BERGAMASCHI, 2010).

As antocianinas presentes na casca de frutos, como o mirtilo, são uma interessante fonte de corantes naturais, de tom que pode variar entre azul, roxo ou vermelho, além de possuir capacidade antioxidante, assim como os demais compostos fenólicos presentes (LEE; FINN; WROLSTAD, 2004).

O crescente interesse dos consumidores por produtos naturais apresenta uma oportunidade de aproveitamento de compostos biativos em subprodutos da indústria alimentícia, podendo ser agregado valor ao processo e viabilizando novos aditivos. Desta forma, buscam-se técnicas de extração eficientes para recuperar os compostos de interesse.

Os compostos bioativos em sua maioria são termolábeis, sensíveis a luminosidade e pH. Devido a estes fatores busca-se uma forma de extração onde haja pouca degradação destes. Segundo Péres-Jiménez et al., (2008), a eficácia da extração está intimamente ligada a temperatura de extração e às características do solvente empregado, como polaridade, que pode afetar a transferência de elétrons e átomos de hidrogênio.

A extração com líquido pressurizado (PLE - Pressurized Liquid Extraction) está entre as técnicas mais recentes que apresentam diversas vantagens sobre técnicas convencionais. Esta baseia-se na utilização de solventes os quais são submetidos à altas pressões, geralmente variando de 4 a 20 Mpa e moderadas temperaturas a partir de 25°C até 100°C, a fim de extrair determinados compostos de matrizes sólidas ou semi-sólidas em um curto tempo e com a utilização de pequena quantidade de solvente. A técnica é uma alternativa atraente, que

permite a extração de forma rápida e reduz o consumo de solvente. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para a extração de compostos fitoquímicos termolábeis de vários vegetais, como casca de jabuticaba, semente de uva, semente de urucum, bagaço de amora-preta, bagaço de mirtilo, folhas de oliva e outros (FREITAS, 2007; STALIKAS, 2007; LUTHRIA, 2008; MONRAD et al., 2010; SANTOSb et al., 2012; CAVALCANTI, 2013; RODRIGUES, 2013; MACHADO, 2014; PAES et al., 2014; COPPA, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo geral avaliar extratos contendo antioxidantes, como compostos fenólicos e antocianinas, a partir do subproduto gerado na fabricação do suco de mirtilo, através da utilização da extração com líquido pressurizado (PLE).

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o subproduto de mirtilo quanto ao pH, acidez, sólidos solúveis e umidade;
- Realizar extração com líquido pressurizado testando diferentes solventes;
- Analisar as curvas de cinética de extração;
- Determinar atividade antioxidante, o conteúdo de antocianinas e compostos fenólicos totais dos extratos obtidos pelas técnicas de extração com líquido pressurizado (PLE) e maceração;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mirtilo

O mirtilo (*Vaccinium* sp) é um arbusto, membro da família Ericaceae, subfamília Vaccinoideae e gênero Vaccinium (TREHANE, 2004). É nativo da Eurásia e que também cresce em sub-bosques das florestas temperadas da Europa e da América do Norte (Estados Unidos e Canadá) onde é denominado "blueberry", muito apreciado por seu sabor, pelo valor econômico e por suas propriedades medicinais. Estes poderes devem-se especialmente ao alto conteúdo de antocianidinas contidas nos pigmentos hidrossolúveis de cor azul-púrpura (RASEIRA & ANTUNES, 2004).

O fruto foi introduzido no Brasil em 1983, pela Embrapa Clima Temperado, em Pelotas (RS), a partir de plantas provenientes da Universidade da Flórida, esta coleção de cultivares foi a principal base para difusão da cultura no país (RASEIRA; ANTUNES, 2004).

No Brasil, as principais cultivares pertencem ao grupo rabitteye. Apresentam como características: elevado vigor, plantas longevas, alta produtividade, tolerância ao calor e à seca, baixa exigência na estação fria, floração precoce, longo período entre floração e maturação (RASEIRA; ANTUNES, 2006; EHLENFELDT et al., 2007).

O mirtilo, além de apresentar um sabor exótico, possui potencial econômico, elevada rentabilidade e propriedades funcionais que trazem benefícios para a saúde, sendo conhecido como "fruto da longevidade" (RASEIRA; ANTUNES, 2004).

O mirtileiro produz frutos com diâmetro entre 8 e 22 mm, de sabor agridoce. Como pode ser visto na Figura 1, apresenta aparência semelhante ao araçá, é de cor azul-escura, formato achatado, coroado pelos lóbulos persistentes do cálice, com muitas sementes que se encontram envolvidas em uma polpa de coloração esbranquiçada, com aproximadamente 1,5 a 4 g de peso (KLUGE; HOFFMANN; BILHALVA, 1994; CHILDERS; LYRENE, 2006; RODRIGUES et al., 2007).

Figura 1- Imagem de mirtilo (*Vaccinium* sp).

Fonte: http://viviennearonowitz.com/

Os frutos podem ser utilizados para consumo “in natura”, sucos, geleias, iogurtes, entre outros, porém a oferta ainda é muito pequena, o que o torna o fruto pouco conhecido da maioria da população brasileira, inclusive pela população do sul do país, que é a região mais recomendada para o cultivo (DONADIO; NACHTIGAL; SACRAMENTO, 1998).

A maior parte dos compostos bioativos permanece no bagaço de mirtilo sendo por este motivo uma fonte natural de corantes e de compostos com propriedades antioxidantes (LI et al., 2012).

3.1.3 Aspectos econômicos

O mirtilo apresenta grande importância comercial, especialmente nos Estados Unidos e em alguns países da Europa, como Itália e Alemanha (STRIK, 2005; BRAZELTON; STRIK, 2007). Os norte-americanos importam 82% da produção do restante do mundo, apesar de ser o maior produtor e consumidor da fruta, o país não é autossuficiente e depende do abastecimento de outros países nos períodos de entressafra. No Brasil, a produção de pequenas frutas como o mirtilo, ainda são restritas a poucas áreas, mas as perspectivas de cultivo são promissoras. As áreas com maior produção estão concentradas nas cidades de Vacaria (RS), Lavras (MG) e Campos do Jordão (SP) (RASEIRA; ANTUNES, 2004; ANTUNES; MADAIL, 2005). Segundo Fachinello (2008), a área de plantio no Brasil é superior a 150 ha, sendo a maior parte no Rio Grande do Sul, com 45 produtores que geram em torno de 150 toneladas em 65 ha de área de plantio.

O cultivo comercial do mirtilo está em franca expansão em países da América do Sul como Chile, Argentina e Uruguai, com área de produção de aproximadamente 6.500 ha. A expansão da cultura nesses países é influenciada, em grande parte, pela demanda da entressafra de países do hemisfério norte como os Estados Unidos (STRIK, 2005; BRAZELTON; STRIK, 2007).

Um fator importante para o aumento das áreas cultivadas com mirtilo é o crescente interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos (WOLFE; WU; LIU, 2003; MANACH, 2004).

Essas demandas de mercado podem gerar oportunidades de negócio para o setor produtivo brasileiro, desde que haja adoção de tecnologia para a produção e a utilização de cultivares adequadas (ANTUNES; MADAIL, 2005).

3.1.4 Composição e valor nutricional

O mirtilo apresenta diversas propriedades nutracêuticas e alto potencial antioxidante, em razão da presença de compostos fenólicos (KALT; JOSEPH; SHUKITT-HALE, 2007). Além disso, pesquisas recentes têm destacado múltiplas funções e mecanismos importantes relacionados à habilidade dos compostos fenólicos de se ligarem a receptores celulares e transportadores de membranas e influenciarem a expressão gênica, a sinalização e a adesão celular (MANACH, 2004). Buran et al. (2012) destaca que o mirtilo pode auxiliar na prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e diabetes. A Tabela 1 apresenta a composição e perfil nutricional encontrado em 100 g de mirtilo.

Tabela 1 - Perfil nutricional do mirtilo.

Nutrientes em 100 g do fruto	
Umidade	83-87 g
Valor energético	51-62 kcal
Proteínas	0,4-0,7 g
Lípidios	0,5 g
Glicose	5-7 g
Frutose	5-7 g
Sacarose	Nd
Fibra	1-1,5 g
Cinza	0,19-0,25 g
Sais minerais	
Cálcio	11,4 – 12,2 mg
Ferro	0,6 mg
Magnésio	5,8 – 8,4 mg
Fósforo	14 – 47 mg
Potássio	48 – 112 mg
Sódio	3,4 – 4,3 mg
Zinco	0,1 mg
Cobre	0,1 mg
Manganês	0,4 – 1,2 mg
Vitaminas e outros componentes	
Vitamina C	22-62 mg
Taninos	270-550 mg
Pectinas	300-600 mg
Antocianinas	300-725 mg

Fonte: Rodrigues, et al. (1992).

Os compostos fenólicos comportam-se como sequestradores de radicais livres e possuem propriedades interessantes para a área alimentar, medicinal e nutracêutica. A atividade antioxidante dos mirtilos é influenciada pelo teor em compostos fenólicos, em particular o teor de antocianinas totais presente em elevadas concentrações na película do fruto, além disso, estes compostos possuem efeitos benéficos adicionais a saúde, como o efeito antimicrobiano (KHALIFA et al., 2015; SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015). A concentração destes compostos bioativos depende do genótipo, das condições ambientais, da

maturação, das condições de pré e pós-colheita (armazenamento), do processamento do fruto e dos procedimentos de extração (CASTREJÓN et al., 2008).

Segundo Sousa et al. (2006) os flavonoides do mirtilo são reconhecidos pelas propriedades anticancerígenas, sendo a capacidade antioxidante das antocianinas a propriedade biológica mais importante.

3.2 Resíduos da indústria alimentícia

Nas duas últimas décadas, a população mundial cresceu de maneira acentuada, fazendo aumentar a demanda por alimentos e assim consequentemente aumentando os resíduos e subprodutos do processo de indústrias alimentícias, representando um crescente problema. Os resíduos de frutas, hortaliças e sementes são geralmente propensos à degradação, e muitas vezes destinados para utilização na ração animal ou na forma de fertilizantes (PEREIRA et al., 2003; SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001).

Os resíduos vegetais possuem altos teores de vitaminas, sais minerais e componentes bioativos, que atuam na assimilação de outros nutrientes e auxiliam na prevenção de doenças. Estes subprodutos podem ser utilizados como fontes alternativas de compostos bioativos, além disso, tornando-se uma forma eficaz de se reduzir a poluição ambiental, podendo agregar valor ao produto e diminuir o custo de industrialização. As substâncias biologicamente ativas mais comumente encontradas são: compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e carotenoides, que têm impulsionado o desenvolvimento de pesquisas por produtos que contribuam com a melhoria da qualidade de vida, provenientes especialmente de fontes naturais. Consequentemente, na tentativa de atender as novas exigências do mercado faz-se necessário a busca por novas tecnologias que proporcionem benefícios ao consumidor e ao mesmo tempo diminua as perdas econômicas (GIOVANNINI, 1997; CONSTANT, 2003; PESCHEL et al., 2006).

Sendo o mirtilo uma fruta sazonal e de elevada perecibilidade é usualmente processado de diferentes formas como sumos, purés, geleias ou produtos enlatados para posterior consumo. Durante o processamento do fruto os compostos fenólicos constituintes, em especial as antocianinas, sofrem degradação. O uso de altas temperaturas pode diminuir a qualidade nutricional das frutas, assim como influencia o seu perfil fenólico e a sua capacidade antioxidante (GALLEGOS-INFANTE et al., 2009; REYES et al., 2011).

No Brasil grande quantidade de mirtilo é processada, assim inevitavelmente são gerados subprodutos residuais como caules, sementes e cascas, sendo denominado de bagaço, os quais são ricos em antocianinas e outros compostos polifenóis, sendo uma interessante

fonte de corantes naturais e compostos antioxidantes (LEE; DURST; WROLSTAD, 2002; LEE; WROLSTAD, 2004). Segundo Kechinski (2011), o processo de extração do suco de mirtilo gera em torno de 20 % de resíduo sólido (bagaço) e neste ficam cerca de 63 % do teor de antocianinas totais presentes no fruto.

O interesse pelos antioxidantes e compostos naturais de extratos de plantas teve expressivo crescimento, devido a demanda por aditivos com baixa toxicidade em relação aos sintéticos (WOLFE; WU; LIU, 2003; MANACH, 2004).

3.3 Compostos fenólicos

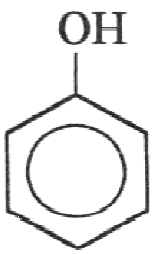
Compostos fenólicos ou polifenóis são substâncias amplamente distribuídas na natureza. Fazem parte dos constituintes de uma variedade de vegetais e frutas, além de estar presente em seus produtos industrializados (BRAVO, 1998).

A quantidade de compostos fenólicos encontrados em cada fruta pode estar relacionada a fatores como a variedade, localização geográfica da planta, condições ambientais e climáticas durante o crescimento da mesma (fertilização, temperatura, luz e água), assim como com a incidência de doenças. Além disso, podem ser influenciados também por fatores como condições de amadurecimento e armazenamento pós-colheita dos frutos e por processos tecnológicos utilizados na elaboração e armazenamento dos produtos derivados (ZADERNOWSKI, NACZK E NESTEROWICZ, 2005; KING; YOUNG, 1999).

O reconhecimento das propriedades antioxidantes destes compostos tem evocado uma nova visão em direção aos efeitos benéficos para a saúde que eles podem apresentar. (OLIVEIRA, 2010).

Segundo Severo et al. (2009) a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos pode ser atribuída aos grupamentos hidroxila, que se unem aos radicais livres sendo que estes apresentam número ímpar de elétrons, a Figura 2 apresenta a estrutura básica de um composto fenólico, também conhecido como fenol ou ácido fênico.

Figura 2- Estrutura básica dos compostos fenólicos.



Fonte: Angelo e Jorge (2007).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. Esta atividade dependerá da estrutura química do composto, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (OLDONI, 2004). A Tabela 2 apresenta as várias classes de compostos fenólicos que podem ser encontrados em plantas.

Tabela 2- Classificação dos compostos fenólicos em plantas.

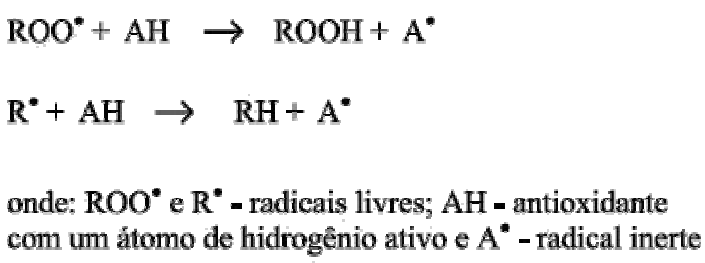
Classe	**Estrutura**
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_3-C_1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	C_6-C_1-C_6
Estilbenos, antoquinonas	C_6-C_2-C_6
Flavonoides, isoflavonoides	C_6-C_3-C_6
Lignanas, neolignanas	$(C_6$-$C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$
Ligninas	$(C_6$-$C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6$-C_3-$C_6)_n$

Fonte: Angelo e Jorge (2007).

Segundo Bailey (1996), os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos.

Compostos fenólicos são antioxidantes primários que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (BAILEY, 1996; SIMIC, JAVANOVIC, 1994; NAMIKI,1990), como pode ser observado na Figura 3 que apresenta a ação dos antioxidantes primários.

Figura 3- Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.

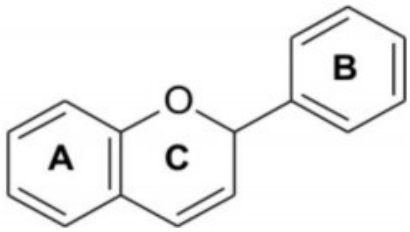


Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

3.3.1 Flavonoides

Os flavonoides constituem a maior classe de fenólicos vegetais. Devido as suas cores atrativas, flavonas, flavonóis e antocianidinas contribuem como sinais visuais para insetos durante a polinização (STALIKAS, 2007). Estruturalmente constituem compostos de baixo peso molecular, consistindo de 15 átomos de carbono, contendo um esqueleto comum de difenilpiranos (C_6-C_3-C_6), compostos por anéis fenil ligados através de um anel pirano (heterocíclico) (Figura 4).

Figura 4- Estrutura química dos flavonoides.



Fonte: Angelo e Jorge (2007).

A atividade antioxidante dos flavonoides depende da propriedade redox de seus grupos hidrofenólicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química (ANGELO; JORGE, 2007).

De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavonas e flavonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorres como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (OLDONI, 2007; STALIKAS, 2007).

3.3.1.1 Antocianinas

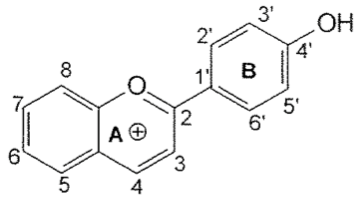
As antocianinas constituem o maior grupo de pigmentos aquosolúveis encontrados na natureza, sendo responsáveis pelas cores que vão do laranja passando pelo vermelho e do violeta até o azul escuro de muitas flores, frutos, folhas, raízes e caules encontrados na natureza (DELGADO-VARGAS; JIMENEZ; PAREDES-LOPEZ, 2000; ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

As funções desempenhadas pelas antocianinas nas plantas são variadas: antioxidantes, proteção à radiação ultravioleta, mecanismo de defesa e função biológica. As cores vivas e intensas têm um importante papel na atração de polinizadores e dispersão das sementes (MALACRIDA; MOTTA, 2005; LOPES et al., 2007).

Em especial no mirtilo, a cor está estreitamente correlacionada com o teor de antocianinas do fruto e este, por sua vez, está relacionado com o pH e o ratio (relação sólidos solúveis e acidez total) (SELLAPPAN et al., 2002).

As duas classes de flavonoides consideradas mais importantes são os flavonóis e as antocianidinas. As antocianidinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico (2-fenilbenzopirílio) como mostra a Figura 5 (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

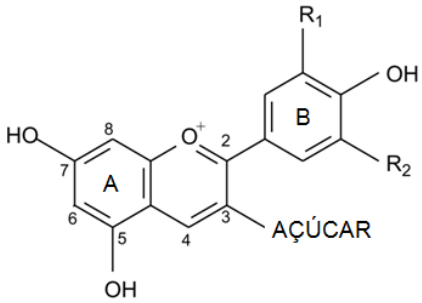
Figura 5- Estrutura do cátion flavílico.



Fonte: Favaro (2008).

Essa classe de compostos ocorre naturalmente na forma heteroglicosídica, contendo duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos (CIPRIANO, 2011). A Figura 6 apresenta a estrutura básica de uma antocianina.

Figura 6- Estrutura química básica de uma antocianina.



Fonte: Simões et al. (2003).

São conhecidas aproximadamente 23 agliconas, das quais 18 ocorrem naturalmente na natureza e dessas somente 6 (pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e malvidina) estão presentes nos alimentos (MALACRIDA; MOTTA, 2006; FRANCIS, 2000). A Tabela 3 apresenta os nomes, os grupos substituintes R1 e R2 e as colorações, das principais antocianidinas encontradas na natureza.

Tabela 3- Nomes e grupos substituintes R1 e R2 das principais antocianidinas encontradas na natureza e sua respectiva coloração.

Antocianidina	**R_1**	**R_2**	**Coloração**
Cianidina	OH	H	Vermelho-laranja
Delfinidina	OH	OH	Azul-vermelho
Malvidina	OCH_3	OCH_3	Azul-vermelho
Pelargonidina	H	H	Vermelho
Peonidina	OCH_3	H	Vermelho-laranja
Petunidina	OH	OCH_3	Azul-vermelho

Fonte: Borges et al. (2014).

Kong et al. (2003), relata que a distribuição das antocianidinas em diferentes partes de frutas e vegetais é: cianidina – 50%, delfinidina – 12%, pelargonidina – 12%, peonidina – 12%, petunidina – 7% e malvinidina – 7%. Desta forma, ressaltando que a cianidina é a antocianidina mais presente nos vegetais.

As antocianinas têm uma ou mais de suas hidroxilas ligadas a açúcares, diferente das antocianidinas que não possuem açúcares. Os mais comuns açúcares ligados às antocianinas são: glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008; MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

Quando isoladas as antocianinas são extremamente instáveis e bastante susceptíveis à degradação (GIUSTI; WROLSTAD, 2003). Tanto as características de cor (tonalidade e saturação) dos pigmentos como sua estabilidade são muito influenciadas pelos substituintes na aglicona. A degradação das antocianinas geralmente ocorre durante a sua extração dos tecidos vegetais e também durante o processmento e armazenamento dos alimentos (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2008).

Os principais fatores que influenciam a estabilidade das antocianinas são a estrutura química, o pH, a temperatura, a luz, a presença de oxigênio, a degradação enzimática e as interações entre os componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos (FRANCIS; MARKAKIS, 1989).

Narayan et al. (1999), descrevem que as antocianinas são um potente antioxidante quando comparado aos antioxidantes clássicos como o butilato hidroxi anisol (BHA), butilato hidroxi tolueno (BHT) e alfa tocoferol (vitamina E). As antocianinas quando adicionadas a alimentos, além de conferir a coloração propicia a prevenção contra auto-oxidação e peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos.

3.4 Extração de compostos bioativos de resíduos vegetais

A técnica de extração empregada na obtenção de extratos de produtos naturais influencia diretamente na sua qualidade e sua composição final. O procedimento de extração é determinado pela família de compostos a ser extraída e se o objetivo é quantitativo ou qualitativo. O rendimento e a composição dos extratos dependem tanto do solvente utilizado como do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes, pois a solubilidade de substâncias se dá em função de uma afinidade química existente entre as espécies do sistema em função de sua polaridade e solvente empregado. Quando o objetivo é obter corantes ou produtos antioxidantes para a indústria de alimentos, as extrações geralmente são realizadas utilizando água, álcoois ou uma mistura deles, como é o caso dos flavonoides por serem compostos polares. Na maioria dos casos, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução do soluto (OLIVEIRA, 2010).

Os solventes extratores alcoólicos acidificados têm o poder de desnaturar as membranas das células do tecido vegetal, auxiliar a penetração do solvente e dissolver os pigmentos mais facilmente, favorecendo desta forma a extração de compostos como as antocianinas, além de aumentar a estabilidade do extrato (JACKMAN; YADA; TUNG, 1987; REVILLA; RYAN; MARTÍN-ORTEGA, 1998).

Para uma boa eficiência da extração de compostos bioativos também faz-se necessário conhecer outros fatores que influenciam no processo, sendo os dois parâmetros fundamentais que definem o quanto e quão rapidamente os compostos serão extraídos dos tecidos vegetais são: a taxa de transferência de massa e o equilíbrio da concentração entre o interior do vegetal e meio extrativo (CONSTANT, 2003).

3.4.1 Extração por maceração

Entre os métodos mais utilizados para extração encontra-se o método da extração por maceração, onde a matéria vegetal fica em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período, sob agitação ocasional, ou agitação mecânica constante (maceração dinâmica). Neste método não há a renovação do líquido extrator, ocasionando facilmente sua saturação (NAVARRO, 2005).

Diversas variações desta operação objetivam o aumento da eficiência de extração, entre elas: aquecimento do sistema, renovação do líquido extrator e agitação. Apesar dos inconvenientes, ainda é uma das técnicas mais usuais devido à simplicidade e custos reduzidos (SONAGLIO; ORTEGA; PETROVICK, 2001; NAVARRO, 2005).

3.4.2 Extração com líquido pressurizado (PLE)

Na tentativa de superar as limitações do processo de extração, nos últimos anos diversas outras técnicas de têm sido desenvolvidas. Entre elas, a extração com líquido pressurizado (PLE), a qual está recentemente em estudo intensivo, uma vez que estão sendo relatadas inúmeras vantagens sobre os processos tradicionais, tais como boa eficiência, utilização de solventes não poluentes e seguros, flexibilidade no processo devido à seletividade do solvente (CAMEL, 2001; RAMOS; KRISTENSON; BRINKMAN, 2002; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005; MUSTAFA; TURNER, 2011; WIJNGAARD et al., 2012; MACHADO, 2014).

A técnica PLE é também conhecida como extração com fluido pressurizado (PFE), extração com solvente subcrítico, extração acelerada com solvente (ASE), extração com solvente quente pressurizado (PHSE) e extração com solvente a alta pressão (HPSE). Quando 100% de água (solvente ambientalmente amigável) é utilizada como solvente, a PLE é geralmente denotada pelos seguintes termos: extração com água subcrítica (SWE), extração com água quente pressurizada (PHWE), extração com água pressurizada a baixa polaridade, extração com água superaquecida e ainda pode ser encontrado na literatura extração com água

líquida quente ou extração com água a alta temperatura (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005; PRONYK; MAZZA, 2009; MUSTAFA; TURNER, 2011).

A elevada pressão aplicada, geralmente variando de 4 a 20 MPa, garante que o solvente se mantenha no estado líquido na temperatura de processo (RAMOS; KRISTENSON; BRINKMAN, 2002). Esta é a principal razão para a utilização de pressão alta.

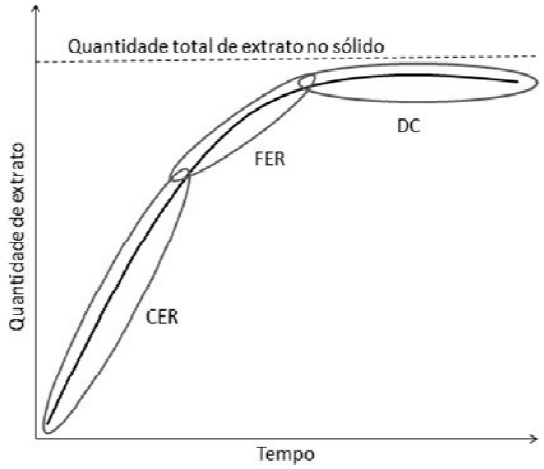
A PLE geralmente requer menos (tempo de extração varia entre 5 a 30 minutos) e menor consumo de solventes que as técnicas convencionais (MENDIOLA et al., 2007). Esta é a razão pela qual a PLE pode ser de interesse comercial, como um método de extração alternativa para a obtenção de compostos bioativos a partir de subprodutos.

3.4.3 Cinética de extração

O estudo da cinética de extração, ou curva global de extração, é o estudo que possibilita compreender melhor o processo de extração e os mecanismos fenomenológicos presentes no processo (MACHADO, 2014).

A construção de uma curva global de extração, também conhecida como *overall extraction curve* (OEC), é feita através da quantificação da massa de extrato ou rendimento global, em função do tempo ou da quantidade de solvente consumido (BRUNNER, 1994). O rendimento global é a quantidade total de material que pode ser extraído de uma matriz em determinada condição de temperatura e pressão, expresso como a razão entre a massa de extrato e a massa de matéria-prima (VASCONCELLOS, 2007). As OEC's podem ser descritas por três estapas, como mostra a Figura 7.

Figura 7- Curva de cinética de extração com suas etapas: taxa de extração constante (CER); taxa de extração decrescente (FER); período difusional (DC).



Fonte: Adaptado de Martínez (2005).

Braga (2005) descreve as três etapas de uma curva de cinética de extração:

- A etapa de taxa de extração constante (CER- *Constant Extraction Rate*) é caracterizada pela fácil extração do soluto que recobre a superfície das partículas ou liberados pelo rompimento das paredes celulares nos processos de preparação, como na moagem por exemplo. Nesta etapa a transferência de massa que predomina é por convecção;
- A etapa de extração decrescente (FER-*Falling Extraction Rate*) caracteriza-se pela camada de soluto de fácil acesso estar se exaurindo, assim a taxa de transferência de massa decresce rapidamente. Nessa etapa, a resistência à transferência de massa encontra-se em ambas as fases e tanto os processos de difusão quanto de convecção passam a ser importantes na extração;
- A etapa de taxa de extração controlada pela difusão (DC- *Diffusion Controlled*) é caracterizada pela ausência de soluto na superfície das partículas e a taxa de extração é determinada apenas pela difusão do solvente para o interior das partículas sólidas, seguida da difusão da mistura soluto/solvente para a superfície das partículas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Obtenção e preparo da matéria-prima

O bagaço de mirtilo, constutuído de pele e semente, gerado após a extração do suco foi gentilmente doado pela empresa Orgânicos Peróla da Terra, situada na cidade de Antônio Prado no Rio Grande do Sul. Após o processo, a empresa encaminhou até a URI – Erechim 9 Kg de bagaço congelado, sendo este acondicionado em freezer convencional -18°C até sua utilização. A Figura 8 apresenta o bagaço de mirtilo úmido, descongelado.

Figura 8- Bagaço de mirtilo.

Fonte: A autora.

A secagem do bagaço de mirtilo foi feita em liofilizador (modelo Modulyo, fabricante Edwards) acoplado a uma bomba de vácuo (modelo RV8, fabricante Edwards). As amostras foram colocadas em placas de petri formando uma fina camada e cobertas por papel alumínio afim de proteger da luminosidade, foram liofilizadas por 48 horas a -40°C. A Figura 9 apresenta o bagaço de mirtilo após a liofilização.

Figura 9- Bagaço de mirtilo após liofilização.

Fonte: A autora.

Após secagem procedeu-se a separação das sementes utilizando-se peneiras granulométricas, a fração que ficou retira na peneira de menor mesh, composta

majoritariamente por sementes, foi moída em moinho de facas (Marconi, MA048), assim ficando as partículas com tamanho entre 30 e 60 mesh.

4.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

- Etanol 95% marca Neon pureza de 99,5%;
- Metanol PA marca Neon pureza de 99,5%;
- Etilenoglicol marca Merck pureza 99,5%;
- Propilenoglicol marca Merck pureza 99,5%;
- Carbonato de sódio marca Synth;
- Folin ciocauteu marca Proton;
- Cloreto de potássio marca Synth;
- Cloreto de sódio marca Synth;
- Acetato de sódio marca Synth;
- Ácido clorídrico marca Dinâmica;
- Ácido gálico marca dinâmica;
- DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) marca Sigma aldrich;

4.2 Metodologia experimental

4.2.1 Análise das propriedades da matéria-prima

O bagaço foi descongelado até temperatura ambiente e fez-se as seguintes análises de caracterização: sólidos solúveis (°Brix) através de refratômetro portátil, acidez total titulável pelo método do Instituto Adolfo Lutz 016/IV, pH através do método do Instituto Adolfo Lutz 017/IV e umidade em analisador por infravermelho (Marte ID-50) conforme descrito por Pauletto (2016).

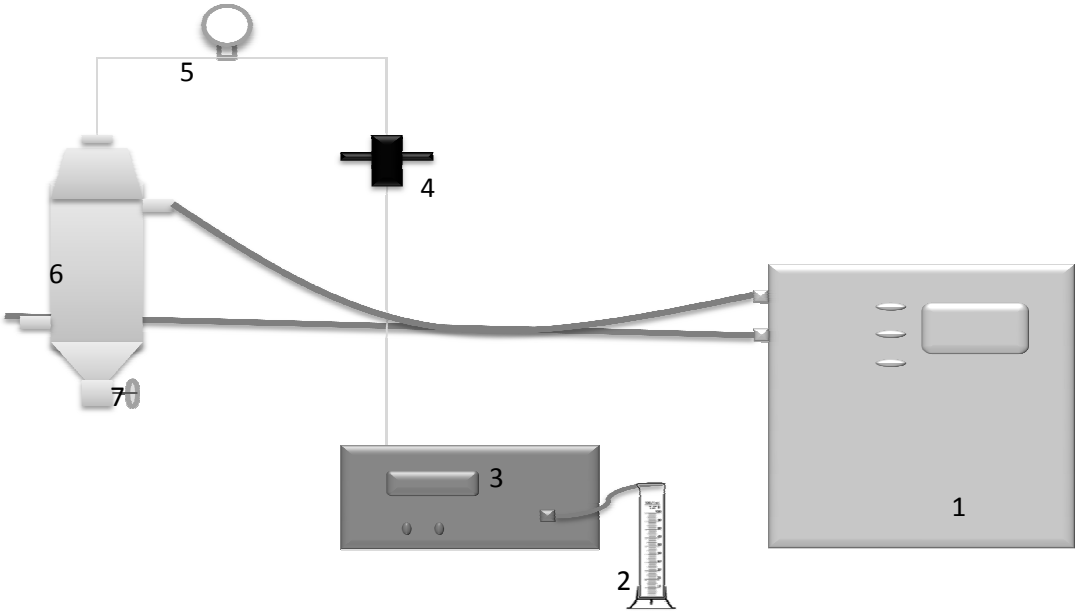
4.2.2 Extração com líquido pressurizado

4.2.2.1 Unidade de extração

O sistema de extração utilizando líquido pressurizado, representado na Figura 10, consiste em um reservatório que contém o solvente, uma bomba, uma válvula de bloqueio, uma célula de extração, uma válvula reguladora de pressão e um frasco para a coleta dos extratos. A célula extratora é encamisada, para possibilitar o controle da temperatura através de banho de água. Depois de preencher a célula de extração com a amostra e ajustar a temperatura, o experimento iniciou-se com o bombeamento do solvente, na vazão

selecionada. A extração propriamente dita iniciou-se quando o sistema atingiu a temperatura e a pressão selecionada.

Figura 10- Unidade de extração PLE.



Fonte: A autora

(1) Banho de água

(2) Reservatório que contém o solvente

(3) Bomba de pressão

(4) Válvula de bloqueio

(5) Manômetro

(6) Célula de extração

(7) Válvula reguladora de pressão

4.2.2.2 Condições de extração

Os procedimentos de extração basearam-se em estudo realizado por Paes et al., (2014), com adaptações, sendo utilizada temperatura de 40°C, pressão de 10,4 Mpa, vazão do solvente de 2 mL/min, extração estática de 30 minutos mais extração de 180 minutos. Os solventes utilizados foram etanol 95%, metanol absoluto, propilenoglicol 20% em solução aquosa (v/v) e etilenoglicol 20% em solução aquosa (v/v), sendo utilizados sem acidificação e acidificados com solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L até atingir pH 3.

O valor de pH foi determinado a partir de estudo realizado por Hentz (2015), onde foi feita a extração de antocianinas de casca de jabuticaba e comparam três diferentes valores de pH: 1, 2 e 3, sendo o pH 3, que obteve maior quantidade antocianinas extraídas, em temperatura de 40°C.

4.2.3 Extração por maceração

O procedimento de extração por maceração buscou aproximar-se ao máximo possível das condições usadas na extração PLE, sendo que o solvente utilizado foi aquele que apresentou maior concentração de compostos fenólicos obtidos por PLE.

Para a extração por maceração utilizou-se 18 g de matéria-prima, que foi transferida para em um erlenmeyer, onde adicionou-se 270 mL do solvente propilenoglicol 20% em solução aquosa (v/v), envolveu-se o erlenmeyer em papel alumínio a fim de evitar degradação pela luz. Utilizou-se plataforma de agitação orbital (shaker) a temperatura de 40°C, agitação de 115 rpm conforme descrito por Hentz (2015) e o tempo total de extração de 180 minutos, sendo feita a retirada 5 mL de alíquotas de extrato a cada 30 minutos para análise dos compostos.

4.2.4 Determinação do rendimento global e cinética de extração

O percentual do rendimento global (X_0) dos extratos obtidos pela técnica PLE foi calculado relacionando a massa total de extrato ($M_{extrato}$) em base seca e a massa de alimentação do resíduo de mirtilo seco ($M_{resíduo}$).

Os frascos utilizados para acondicionar o extrato foram previamente lavados, secados e pesados. Após a extração os frascos foram levados à estufa com circulação de ar para evaporação do solvente até apresentarem peso constante, sendo descontado o peso do frasco, assim obtendo-se a massa do extrato. O rendimento global foi calculado a partir da Equação 1.

$$X_0 = \frac{M_{extrato}}{M_{resíduo}} \times 100 \qquad (1)$$

Para o estudo e construção da curva da cinética de extração (curvas globais de extração), foram obtidos os dados de rendimentos de cada alíquota de extrato recolhida nos seguintes tempos: 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 140, 160 e 180 minutos. Os tempos foram definidos com menor intervalo no início do processo

4.2.5 Teor total de antocianinas monoméricas

A análise de teor total de antocianinas monoméricas (TMA) nos extratos foi realizada pelo método do pH diferencial descrito por Lee; Durst; Wrolstad (2005). O método baseia-se na transformação estrutural da antocianina como uma função do pH em duas soluções tampão: cloreto de potássio, pH 1,0 e acetato de sódio pH 4,5. De acordo com o método a diferença em absorbância das soluções de pH 1,0 e 4,5 é diretamente proporcional à concentração de TMA. A absorbância das amostras tamponadas nos dois diferentes pHs foram determinadas nos comprimentos de 510 nm e 700 nm. A quantidade total de antocianinas monoméricas é calculada como mg/gss de cianidina-3-glucosideo conforme representado pela Equação (2).

$$TMA = \frac{[(A_{510} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\ 4,5}].MW.V.DF.1000}{\varepsilon.m.1} \qquad (2)$$

Na Equação (2) MW representa a massa molar da cianidina-3-glucosidio (449,2 g.mol-1), DF é o fator de diluição da amostra, ε é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glucosidio (26900 l.mol-1.cm-1), 1000 representa a conversão de g para mg, 1 é o caminho da onda na cubeta em cm, V é o volume da solução extraída e m é a massa de sólido seco utilizado na extração. As determinações foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV-1600 Pró-análise.

4.2.6 Compostos fenólicos totais

A análise dos compostos fenólicos totais presente nos extratos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteau, descrito por Singleton e Rossi (1999). O método baseia-se no reagente do Folin-Ciocalteau (mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico) que sofre redução quando reage com compostos fenólicos ou outras substâncias redutoras, na presença do catalisador cobre II, com formação de complexos azulados que absorvem fortemente entre 750 e 765 nm.

Como padrão de referência utilizou-se o ácido gálico, sendo construída uma curva padrão com concentrações entre 0,01 e 0,1 mg/mL. A reação foi realizada em tubos de ensaio, sendo transferidos para estes 0,5 mL de extrato (previamente diluído) ou solução padrão de ácido gálico, em seguida adicionou-se 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteua (diluição 1:10 com água destilada). Aguardou-se 5 minutos e adicionou-se 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5%. Agitou-se os tubos em vortex e deixou-se em repouso em ambiente

escuro por duas horas para que ocorresse a reação. Fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-1600 Pró-análise com comprimento de onde de 760 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados calculados a partir da equação obtida da curva padrão, sendo expressos em mg equivalentes de ácido gálico (mgEAG)/ 100g de resíduo seco.

4.2.7 Atividade antioxidante

A análise da atividade antioxidante total dos extratos do subproduto de mirtilo foi realizada pelo método do sequestro de radicais livres DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), descrito por Brand-Williams et al. (1995). Esta consiste em medir a capacidade de captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm.

Para realização da análise preparou-se uma solução de DPPH diluindo-se 0,0039g em 100 mL de etanol, sendo sempre preparada no dia da análise. Os extratos foram diluídos em etanol, obtendo concentrações entre 10 mg/mL a 0,01 mg/mL. Em tubos de ensaio transferiu-se a solução DPPH e o extrato previamente diluído, agitou-se em vortex e aguardou-se 30 minutos sob abrigo de luz para a ocorrência da reação. O controle consiste na absorção de 50% de etanol e 50% de solução de DPPH e o branco consiste na absorção do etanol. A leitura foi feita em espectrofotômetro UV-1600 Pró-análise em 515 nm. O cálculo da atividade antioxidante foi realizado a partir da Equação 3, e através de regressão linear obteve-se a concentração necessária de extrato para capturar 50% de do radical livre DPPH (IC_{50}).

$$AA(\%) = \frac{100 - (Abs\ amostra - Abs\ do\ branco)x100}{Abs\ controle} \qquad (3)$$

Onde

Abs amostra: absorbância da amostra

Abs do branco: absorbância do branco

Abs controle: absorbância do controle

4.3 Análise estatística

As análises de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para determinar as diferenças estatisticamente significativas em nível de 95% de confiança e 5% de significância, foram realizadas utilizando-se o software Statistica 5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises das propriedades da matéria-prima

Os resultados obtidos nas análises das propriedades do subproduto de mirtilo antes do processo de liofilização são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Resultados das análises das propriedades da matéria-prima.

Análises	Valor médio ± desvio padrão
Acidez total titulável (% ácido cítrico)	0,46 ± 0,01
pH	3,16 ± 0,10
Umidade (%)	65,90 ± 0,55
SS (°Brix)	9,50 ± 0,30

Em estudo realizado por Zardo (2014) ao trabalhar com bagaço de mirtilo este obteve valor de 12°Brix. Santos et al. (2007), relatada que o teor de sólidos solúveis (°Brix) no mirtilo pode variar de 7 em frutos verdes e chegando a 15 em frutos maduros. Assim ficando de acordo com o resultado encontrado de 9,50 °Brix.

Paes (2016) ao analisar os dois diferentes lotes de bagaço de mirtilo após extração do suco obteve resultados de 0,48 e 0,52 % de ácido cítrico, 3,33 e 3,09 de pH, 10,33 e 11,27 de °Brix e umidade 84 e 75,1 %, sendo estes valores próximos aos encontrados neste estudo.

A variação de resultados para a composição físico-química do mirtilo pode variar de acordo com diversos fatores: espécie, variedade, fertilidade do solo, época do ano da colheita, grau de maturação, condições ambientais e prática de cultivo (SILVEIRA; VARGAS; ROSA, 2007).

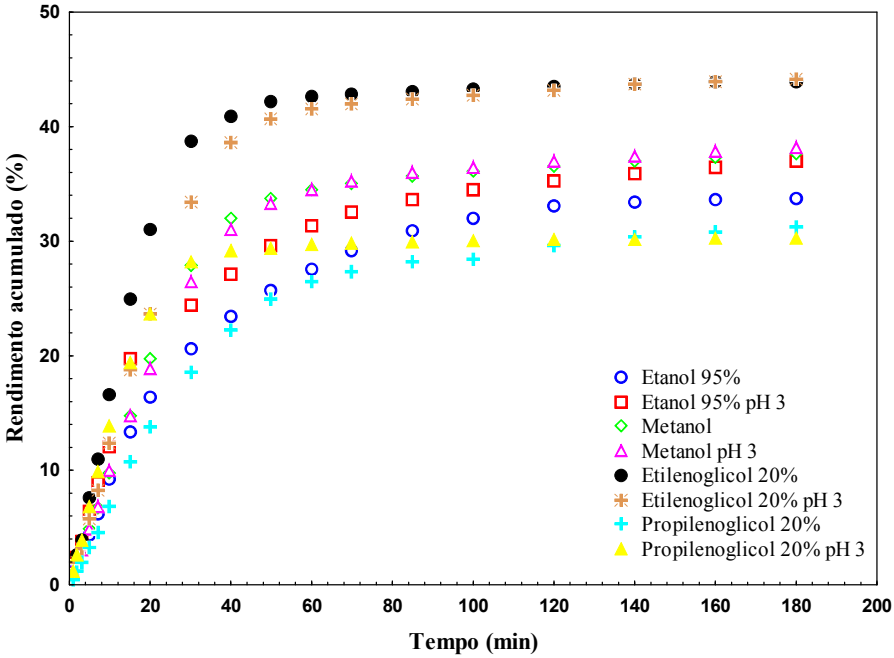
5.2 Extração com líquido pressurizado

5.2.1 Cinéticas de extração

Para poder caracterizar e compreender melhor o processo de extração é preciso compreender os mecanismos fenomenológicos presentes no processo. Desta forma o estudo da cinética de extração (curvas globais de extração) possibilita a aquisição destes conhecimentos, sendo construída a partir dos dados de rendimentos obtidos de cada alíquota durante a extração. A Figura 11 mostra as curvas de cinética de extração de cada solvente.

Através das curvas de cinética de extração percebe-se que a taxa crescente de extração acontece até os 40 minutos, e no decorrer do tempo torna-se constante, para a maioria dos solventes. O propilenoglicol 20% pH 3 apresenta sua máxima extração até os 30 minutos, havendo pouco variação do decorrer do tempo restante. Com o etanol 95% e etanol 95% pH 3, nota-se que sua taxa crescente vai até os 80 minutos. Estas oscilações do período de taxa crescente de extração estão ligadas a facilidade do solvente a se ligar aos compostos que estão mais facilmente disponíveis e arrastá-los, uma vez que o fenômeno de transferência de massa que acontece nesta fase é a convecção. Nos demais períodos o solvente precisa ter a capacidade de penetrar nas partículas para remover os compostos, assim percebe-se através das curvas que a taxa de extração nestes períodos decresce.

Figura 11- Curvas das cinéticas de extração.



A Tabela 5 apresenta o rendimento total obtido por cada solvente ao final dos 180 minutos de extração, com a mesma quantidade de amostra na célula extratora e nas seguintes condições de extração: temperatura de 40°C, pressão de 10,4 MPa, vazão de 2 mL/min e extração estática de 30 minutos.

Tabela 5- Rendimento total de cada solvente.

Solvente	Rendimento (%)
Etanol 95%	33,74
Etanol 95% pH 3	36,95
Metanol	37,69
Metanol pH 3	38,24
Etilenoglicol 20%	43,98
Etilenoglicol 20% pH 3	44,16
Propilenoglicol 20%	31,28
Propilenoglicol 20% pH 3	30,27

O rendimento total é uma medida quantitativa de extrato obtido, mostrando a eficiência do solvente em retirar compostos da matriz vegetal. Através dos dados expostos na Tabela 5 percebe-se que o etilenoglicol 20% pH 3 foi o solvente que obteve maior rendimento total 44,16% e o propilenoglicol 20% pH 3 o solvente com menor rendimento apenas 30,27 %. Ao comparar o rendimento dos solventes na forma normal e acidificados percebe-se um pequeno aumento quando o solvente foi acidificado, isso se deve a maior solubilização de carboidratos e proteínas que ocorre em meios acidificados, exceto para o propilenoglicol 20% que quando utilizado com pH 3 teve uma pequena redução do rendimento.

Em estudo realizado por Paes (2016) com extração PLE de resíduo de mirtilo liofilizado, o rendimento máximo encontrado foi de 8% com água acidificada (pH 2) e o menor de 4,2% com etanol 100%, em 30 minutos de extração, 40°C e 20 Mpa.

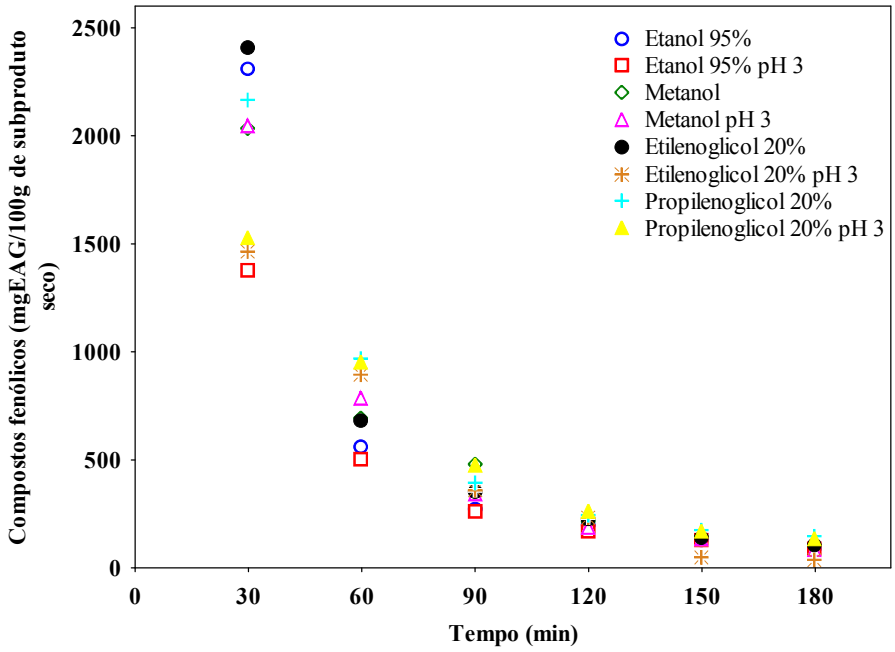
Machado (2014) ao realizar extração PLE de resíduo de amora obteve o maior rendimento global de 14,99% com água pH 2,5, durante 30 minutos de extração 100°C e 75 bar. Valores estes bem menores que os encontrados neste estudo, onde o menor rendimento no tempo de 30 minutos foi de 28,21% com o solvente propilenoglicol 20%.

A variação de rendimento está diretamente ligada ao tamanho das partículas, a moagem é um processo que facilita a extração, uma vez que aumenta a superfície de contato da matéria-prima com o solvente facilitando a transferência de massa e consequente aumentando o rendimento de extração.

5.2.2 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram analisados em alíquotas retiradas a cada 30 minutos de extração, sua quantificação está representada na Figura 12.

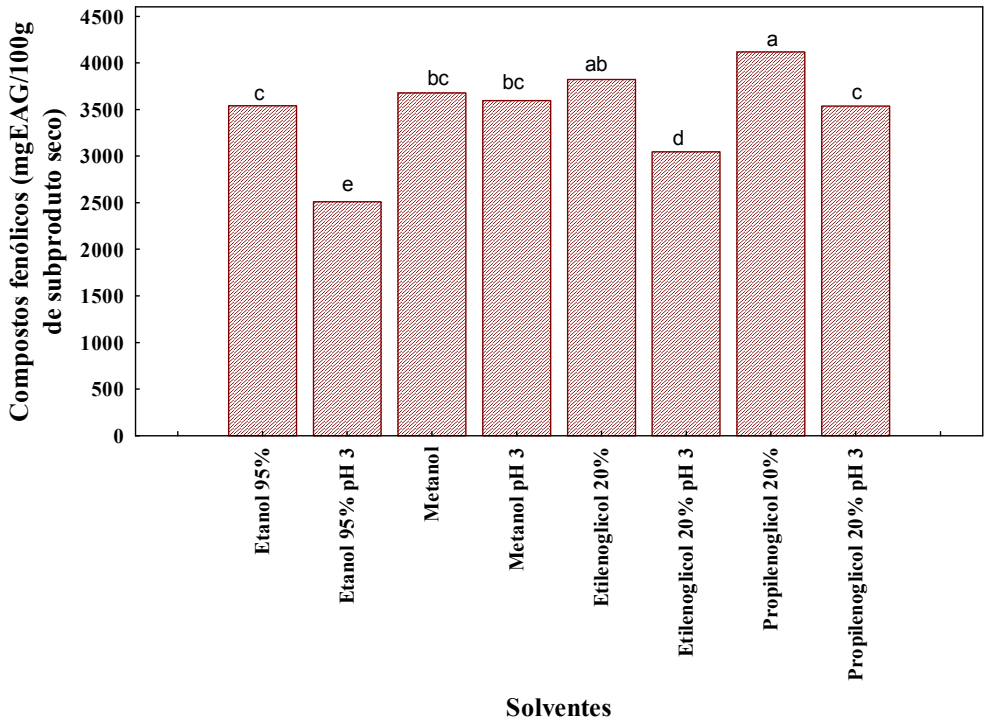
Figura 12- Compostos fenólicos extraídos a cada 30 minutos.



A partir da Figura 12, observa-se a diferença da quantidade de compostos fenólicos extraídos por cada solvente. No tempo de 30 minutos é onde há a maior diferença entre os solventes, o etilenoglicol 20% apresenta a maior quantidade de compostos fenólicos 2403,87 mgEAG/100g de resíduo seco e o etanol 95% pH 3 com a menor quantidade 1375,45 mgEAG/100g. Também é perceptível que no tempo de 30 minutos há a maior quantidade de compostos fenólicos extraídos, apresentando notável diminuição nos 60 minutos e ficando próximo à zero no final da extração.

A Figura 13 apresenta a quantidade de compostos fenólicos extraídos por cada solvente no tempo total da extração (180 minutos). As letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os solventes em nível de 95% de confiança.

Figura 13- Quantidade total de compostos fenólicos extraídos.



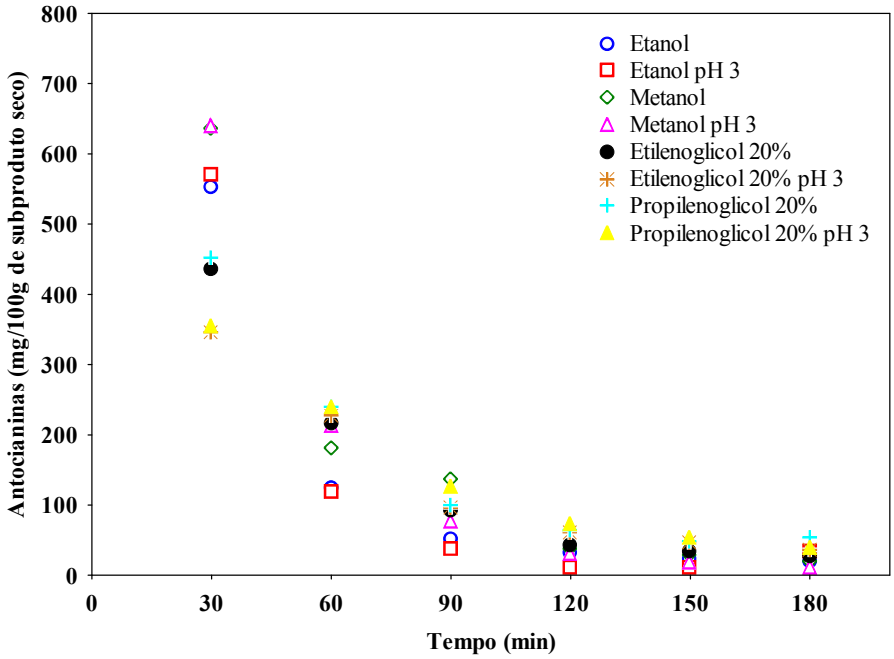
O solvente que extraiu maior quantidade de compostos fenólicos foi o propilenoglicol 20%, que não difere do etilenoglicol 20% e difere estatisticamente dos demais. O etilenoglicol 20%, metanol e metanol pH 3 não diferem estatisticamente, obtendo quantidade similar de compostos fenólicos extraídos. O propilenoglicol pH 3 e o etanol 95% também não diferem entre si, e as menores quantidades de compostos fenólicos foram extraídos pelos solventes etilenoglicol pH 3 e etanol 95% pH 3, respectivamente.

Observa-se que diferentemente do rendimento, a quantidade de compostos fenólicos é maior nos solventes não acidificados e não há relação da quantidade de compostos fenólicos com o rendimento total de cada solvente.

5.2.3 Teor total de antocianinas monoméricas

O teor total de antocianinas monoméricas extraídas por cada solvente, no decorrer de cada 30 minutos, está apresentado na Figura 14.

Figura 14- Teor total de antocianinas monoméricas extraídas a cada 30 minutos.



É possível observar na Figura 14 que há uma notável diferença do teor total de antocianinas extraídas nos primeiros 30 minutos, tendo a quantidade mais elevadas extraídas pelo metanol pH 3 (639,53 mg/100g de subproduto seco), metanol (635,98 mg/100g de subproduto seco), seguido pelo etanol pH 3 (570,36 mg/100g de subproduto seco) e etanol (552,21 mg/100g de subproduto seco), os demais solventes extraíram quantidades inferiores. Ao analisar os demais tempos da extração percebe-se a brusca redução e a aproximação dos valores entre solventes.

Paes (2016) teve o valor máximo de antocianinas extraídas 263 mg/100g de extrato ao utilizar água acidificada como solvente na técnica PLE por 30 minutos de extração, em temperatura de 40°C e pressão de 20 Mpa.

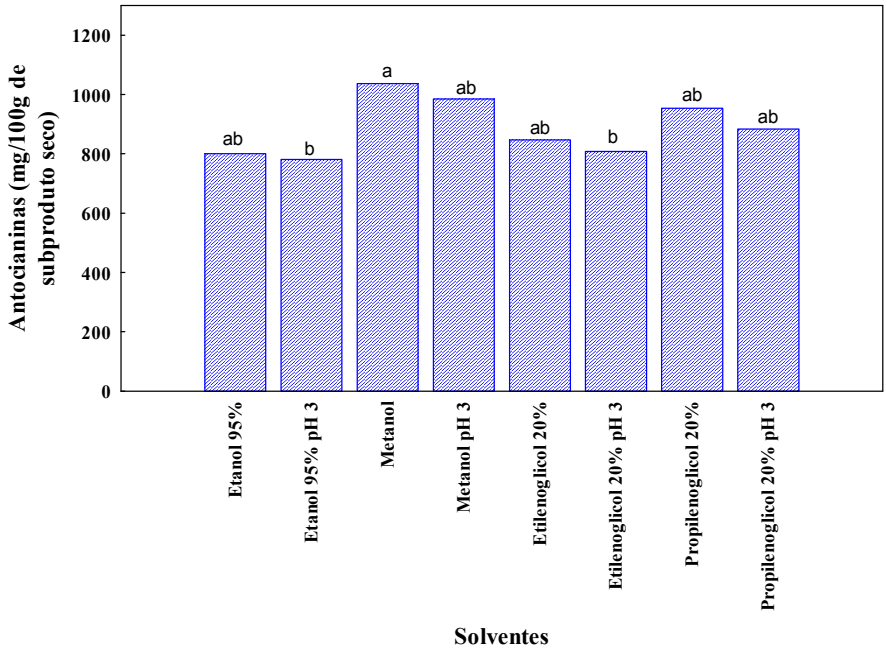
Zardo (2014) obteve o maior valor de extração na condição de 80°C e 5 minutos, com uma quantidade de 1944 mg de antocianinas totais monoméricas (cianidina-3-glucosídeo) por 100 g de bagaço seco, sendo utilizado metanol 50% como solvente e técnica de maceração, valor este superior ao encontrado por Kechinski (2011) que obteve valor máximo de 520,6 mg/100g de bagaço de mirtilo seco, utilizando como solvente água e etanol. Nicoué; Savard; Belkacemi (2007) obtiveram 2.890 mg/100g de fruta em base seca como melhor resultado em antocianinas totais extraídas de mirtilos inteiros a 79°C por 2 horas com etanol a 5% de ácido fórmico.

A grande quantidade de antocianinas extraída a altas temperaturas, como é relatado em outros estudos, se deve ao fato da temperatura promover a permeabilidade dos tecidos e assim facilitar a migração para o solvente (SPANOS; WROLSTAD; HEATHERBELL, 1990). No entanto, antocianinas são sensíveis a altas temperaturas, seu aquecimento consegue destruí-las rapidamente, estudos demonstram haver uma relação logarítmica entre a destruição de antocianinas e o aumento aritmético da temperatura, sendo assim recomendadas temperaturas máximas de 50°C (KECHINSKI, 2011).

Através da Figura 15 pode-se afirmar que a maior quantidade de antocianinas é extraída durante 30 e 60 minutos do processo, ficando inviável mantê-lo por tempo mais prolongado uma vez que as quantidades extraídas se tornam extremamente baixas.

A Figura 15 apresenta o teor total de antocianinas monoméricas extraídas em 180 minutos, por cada solvente. As letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os solventes em nível de 95% de confiança.

Figura 15- Quantidade total de antocianinas monoméricas.



Ao analisar os resultados expressos pela Figura 15, percebe-se que de forma geral não há grande diferença entre os solventes no tempo total de extração, no entanto, o solvente que extraiu maior quantidade de antocianinas foi o metanol com 1036,65 mg/100g de subproduto seco, diferindo estatisticamente apenas de etanol 95% pH 3 com 781,09 mg/100g de subproduto seco e etilenoglicol 20% pH 3 com 808,03 mg/100g de subproduto seco.

Apesar de o metanol conseguir extrair maior quantidade de antocianinas deve-se levar em consideração o fato de ser um solvente tóxico, o processo de remoção dos solventes apresentam um grande dispêndio de energia e custos, além de todo o problema que o solvente residual pode causar alterando as propriedades do extrato e provocando efeitos tóxicos nos consumidores (FREITAS, 2007).

5.2.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante medida pela capacidade de captação do radical DPPH dos extratos é apresentada na Tabela 6 em razão do IC_{50}.

Tabela 6- Valores de IC_{50} obtidos de cada extrato.

Solvente	**IC_{50} (mg/mL)**
Etanol 95%	0,17
Etanol 95% pH 3	0,19
Metanol	0,13
Metanol pH 3	0,14
Etilenoglicol 20%	0,16
Etilenoglicol 20% pH 3	0,19
Propilenoglicol 20%	0,11
Propilenoglicol 20% pH 3	0,12

O propilenoglicol 20% foi o solvente que apresentou o menor IC_{50}, portanto necessita uma menor quantidade para sequestrar 50% de radical livre, este valor apresenta correlação direta com a quantidade de compostos fenólicos, uma vez que este também foi o solvente que apresentou a maior quantidade. Os solventes com maior IC_{50} foram o etanol 95% e etilenoglicol 20% pH 3, sendo estes os solventes que extraíram menor quantidade de compostos fenólicos.

De forma geral todos os extratos apresentam uma boa atividade antioxidante. Piovesan (2016) obteve IC_{50} máximo de 5,57 mg/mL em extrato de mirtilo obtido em extração por ultrassom a 30°C com solvente etanol 60%. Arbos et al. (2010), descreve que valor superiores a 25 mg/mL são considerados baixo potencial antioxidante.

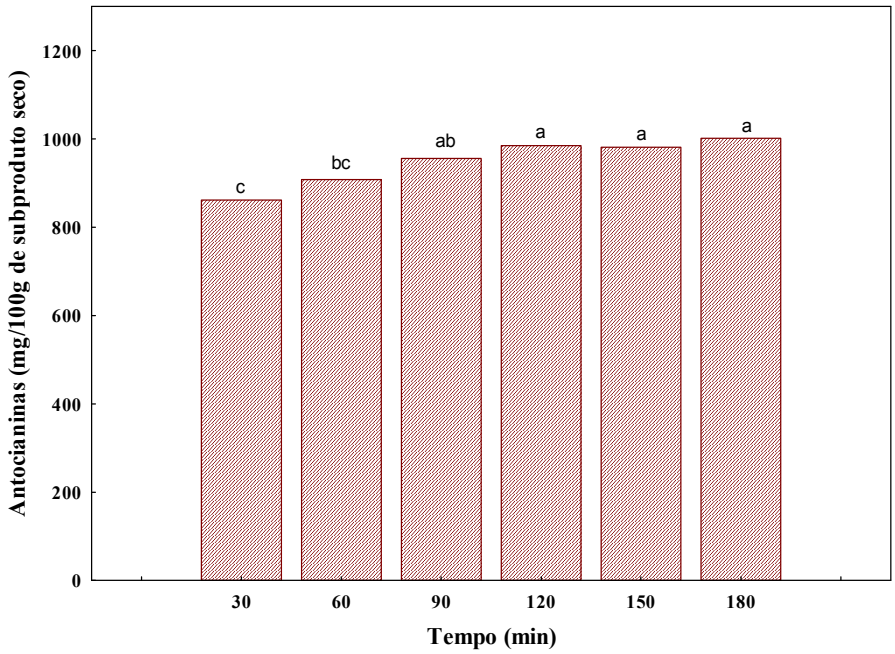
Percebe-se também que não há relação do rendimento total e a atividade antioxidante dos extratos, ficando claro que outros compostos sem atividade antioxidante estão sendo extraídos. Assim podendo se afirmar que o solvente propilenoglicol 20% tem uma maior seletividade para compostos fenólicos já que este obteve o menor rendimento total.

5.3 Extração por maceração

Para realizar a extração por maceração utilizou-se o solvente propilenoglicol 20% devido a sua maior capacidade de extração de compostos fenólicos pela técnica PLE. A Figura 16 apresenta o teor total de antocianinas monoméricas extraídas acumuladas a cada 30 minutos, as letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os solventes em nível de 95% de confiança.

.

Figura 16- Antocianinas extraídas por maceração.



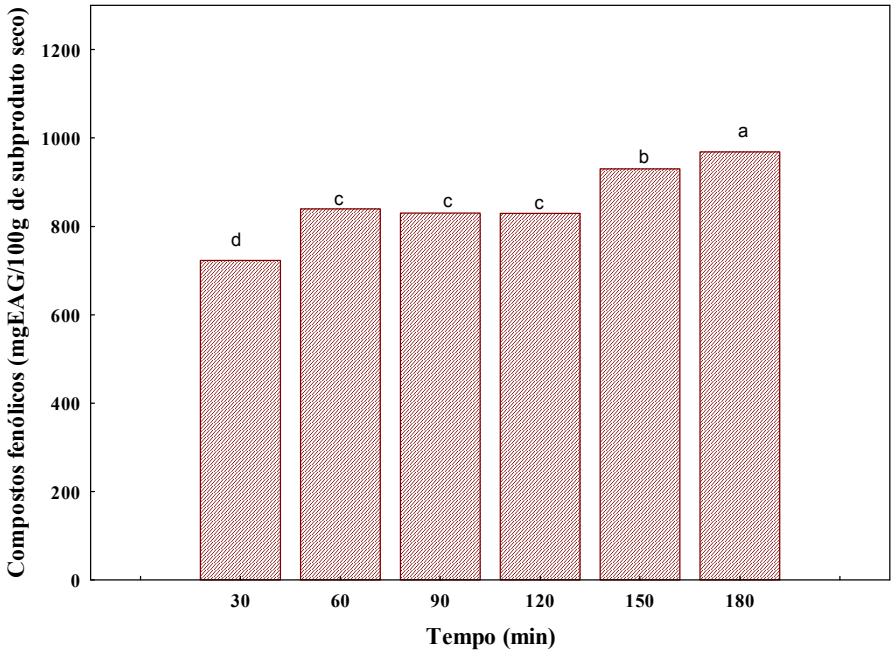
A maior parte das antocianinas é extraída nos primeiro 30 minutos do processo (861,23 mg/100g de subproduto seco), representando 86% da quantidade total. Após 120 minutos não há variação significativa na quantidade extraída, mostrando assim que não há necessidade de um tempo prolongado de extração.

Ao comparar a quantidade total extraída por maceração, que foi 1000,93±1,85 mg/100 g de subproduto seco, com a quantidade extraída pela PLE 953,38±23,25, nota-se uma diferença muito pequena, assim mostrando que a maceração também é eficiente na extração de antocianinas. No entanto a maceração requer um processo de separação ao final da extração, devido à matéria prima fica em suspensão.

Por não haver a troca do solvente durante a extração é possível haver a saturação impossibilitando de se obter uma quantidade maior de compostos.

A Figura 17 apresenta os compostos fenólicos extraídos a cada 30 minutos no decorrer do processo, as letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os solventes em nível de 95% de confiança .

Figura 17- Compostos fenólicos extraídos por maceração.



Grande quantidade de compostos fenólicos é extraída nos primeiros 30 minutos, representando 74,61% do total extraído no decorrer de 180 minutos.

Ao comparar a quantidade extraída por maceração, 968,33±8,77 mgEAG/100g de subproduto seco, com a quantidade extraída por PLE que foi de 4116,62±23,65 mgEAG/100g de subproduto seco, tem-se que pela técnica PLE foi possível extrair 4 vezes mais compostos fenólicos. A Tabela 7 apresenta as quantidades de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante presente nos extratos obtidos pela técnica de maceração e pela técnica de PLE. Para análise da atividade antioxidante utilizou-se a mesma concentração de cada extrato 0,2 mg/mL.

Tabela 7- Comparação entre extração por maceração e PLE.

	Maceração	**PLE**
Compostos fenólicos (mgEAG/100g de subproduto seco)	968,33±8,77	4116,62±23,65
Antocianinas (mg/100g de subproduto seco)	1000,93±1,85	953,38±23,25
Atividade antioxidante (%)	77,20±1,19	82,23±1,20

Analisando os resultados obtidos percebe-se que a quantidade de antocianinas extraídas fica muito próxima pelas duas técnicas, mostrando que para estes compostos tanto a maceração como PLE são eficientes, porém a quantidade de compostos fenólicos por PLE é mais de 4 vezes superior que por maceração, podendo assim ser o fator que influencia a diferença na atividade antioxidante, sendo 5% maior, quando tem-se maior quantidade de compostos fenólicos.

Barros et al., (2013) ao comparar a quantidade de fenóis e atividade antioxidante em extratos de grão de sorgo obtidos pela técnica PLE e convencional obteve resultados de fenóis iguais, no entanto a atividade antioxidante foi 12% maior pela técnica PLE.

Santos et al., (2012) otimizaram a extração de compostos fenólicos da casca de jabuticaba, através da PLE, utilizando etanol como solvente. Nas condições otimizadas o teor de antocianinas e outros compostos fenólicos foi duas vezes superior ao determinado pela extração convencional.

Garcia-Salas et al., (2010) apontam que devido a técnica de extração PLE ser realizada na ausência de luz e ar, os processos de degradação e oxidação dos compostos são reduzidos drasticamente em comparação a outra metodologias. E devido a associação de temperatura e pressão existe uma aumento da solubilidade dos analítos, da taxa de transferência de massa e, também diminui a viscosidade e a tensão superficial dos solventes, melhorando o rendimento da extração (IBANEZ et al., 2012).

Além disso, pela PLE utilizar pequena quantidade de solventes orgânicos, esta metodologia tem sido reconhecida como uma “técnica limpa” (IBANEZ et al., 2012; HERRERO et al., 2013).

Assim podendo-se afirmar que a técnica PLE apresenta vantagem na extração de compostos fenólicos, porém Segundo Dai e Mumper (2010) os custos com a instrumentação deste método em escala industrial são altos, diminuindo a viabilidade de implantação.

6 CONCLUSÃO

Em busca de aprimorar o aproveitamento de subprodutos de indústrias para gerar novas alternativas naturais os extratos da casca de mirtilo obtidos através da técnica PLE mostraram uma boa atividade antioxidante e teores significativos de compostos fenólicos totais e antocianinas.

O solvente que demonstrou uma maior capacidade de extração dos compostos fenólicos foi o propilenoglicol 20% em solução aquosa.

Através das curvas de cinéticas de extração pode-se observar as fases da extração e concluir que o processo pode ter seu tempo reduzido a 60 minutos, o que minimizará custos de produção.

Ao se comparar os resultados obtidos pela técnica PLE com a técnica convencional amplamente utilizada, maceração, os resultados demonstraram que a maceração também tem boa capacidade de extração de antocianinas, em período de 180 minutos de extração, porém quanto aos demais compostos fenólicos a PLE mostrou-se mais eficiente.

A partir dos resultados de IC_{50} percebe-se que os extratos obtidos tem uma grande atividade antioxidante, podendo ser utilizados em pequena quantidade.

Este estudo apresenta a possibilidade de aproveitamento de subproduto de mirtilo frente a sua significativa quantidade de compostos com propriedades antioxidantes e como a técnica PLE se mostra vantajosa, assim como o solvente propilenoglicol em solução aquosa se destaca dos solventes convencionais ao extrair maior quantidade de compostos fenólicos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar outras técnicas de extração, como ultrassom, que pode ser associada a PLE;
- Realizar análise de custos;
- Analisar as propriedades antimicrobianas dos extratos;
- Analisar a estabilidade térmica das antocianinas extraídas;
- Encapsulação do extrato visando a proteção dos compostos;
- Aplicação do extrato em alimentos;

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, O. M., JORDHEIM, M., **The anthocyanins.** In: O. M. Andersen, K. R. Markham (Org.). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006, p. 471–551. (ver)

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 1-9, 2007.

ANTUNES, L. E. C.; MADAIL, J. C. M. Mirtilo: que negócio é este? **Jornal da Fruta,** v. 13, p. 8, 2005.

ARBOS, K. A.; FREITAS, R. J. S. D.; STERTZ, S. C.; DORNAS, M. F. Antioxidant activity and phenolic content in organic and conventional vegetables. **Food Science and Technology**, v.30, p. 501-506, 2010.

BAILEY, A. E.; **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 5th ed., John Wiley: New York, 1996.

BARROS, F.; DYKES, L.; AWIKA, J.N.; ROONEY, L.W. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. **Journal of Cereal Science**, v.58, p. 305-312, 2013.

BERGAMASCHI, K. B. Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BORGES, J. M.; DOS SANTOS, M. D.; LEANDRO, F. P.; TOLEDO, A. L. DE S.; FIGUEIREDO, A. P.; DOMINGUINI, L. Estudo da estabilidade de antocianinas em diferentes alcoóis alifáticos para uso como indicador de pH. **Revista Ciências Exatas e Naturais.** v. 16, p. 129-142, 2014.

BRAGA, M. E. M. Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo. **Tese de doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BRAZELTON, D.; STRIK, B. C. Perspective on the U.S. and global blueberry industry. **Journal of American Pomological Society**, v.61, p.144-147, 2007.

BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. STEINKOPFF, D. New York : Springer, 1994.

BURAN, T. J; SANDHU, A. K.; AZEREDO, A. M.; BENT, A. H.; WILLIAMSON, J. G.; GU, L. Effects of exogenous abscisic acid on fruit quality, antioxidant capacities, and phytochemical contents of southern high bush blueberries. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1375-1381, 2012.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **Analyst**, v. 126, n. 7, p. 1182-1193, 2001.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1–2, p. 1-17, 2005.

CASTREJÓN, A.D.R.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L. W.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry,** v. 109, p. 564-572, 2008.

CAVALCANTI, R. N. Extração de antocianinas de resíduos de jabuticaba (Myrciaria cauliflora) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítica: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

CIPRIANO, P. A. Antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e casca de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) na formulação de bebidas isotônicas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

CONSTANT, P. B. L. Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (Euterpe oleraea, M.). **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

COPPA, C. F. S. C. Extração de oleuropeína de folhas de oliva com solvente hidroalcoólico e efeito dos extratos sobre a estabilidade oxidativa de óleos vegetais. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

CHILDERS, N.F.; LYRENE, P.M. **Blueberries for growers, gardeners, promoters**. Florida: E. O. Painter Printing Company, 2006. 266p.

DAI, J., MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v.15, p. 7313-7352, 2010.

DELGADO-VARGAS F., JIMENEZ, A.R., PAREDES-LOPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains: characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 173-289, 2000.

DONADIO, L. C.; NACHTIGAL, J. C.; SACRAMENTO, C. K. **Frutas exóticas.** FCAV-UNESP. Jaboticabal, SP. 1998. 279p.

EHLENFELDT, M.K.; ROWLAND, L.J.; OGDEN, E.L.; VINYARD, B.T. Floral bud cold hardiness of *Vaccinium ashei*, *V. constablaei*, and hybrid derivatives and the potencial for producing Northern-adapted rabbiteye cultivars. **HortScience**, v.42, p.1131-1134, 2007.

FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 285-576, 2008.

FAVARO, M. M. A. Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artemed, 2008.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. Cereal **Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

FRANCIS, F. J.; MARKAKIS, P. C.; Food colorants: Anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 28, p. 273-314, 1989.

FREITAS, L. S. Desenvolvimento de procedimentos de extração de óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GALLEGOS-INFANTE, J.A.; ROCHA-GUZMAN, N.E.; GONZÁLEZ-LAREDO, R.F.; REYNOSO-CAMACHO, R.; MEDINA-TORRES, L.; CERVANTES-CARDOZO, V. Effect of air flow rate on the polyphenols content and antioxidant capacity of convective dried cactus pear cladodes *(Opuntia ficus indica).* **International Journal Food Science Nutritional**, v. 60, p. 80-7, 2009.

GARCIA-SALAS, P., MORALES-SOTO, A., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules**, v. 15, p. 8813-8826, 2010.

GIOVANNINI, E. Aproveitamento de resíduos da industrialização de frutas. **Agropecuária Catarinense**, v. 10, n. 2, 1997.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Jounal**, v. 14, p. 217-225, 2003.

HENTZ, R. Otimização da extração de antocianinas da casca da jabuticaba (Myrciaria cauliflora) e avaliação da capacidade antioxidante. **Dissertação de mestrado**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2015.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBANEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p.1-9, 2013.

IBANEZ, E., HERRERO, M., MENDIOLA, J.A., CASTRO-PUYANA, M. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In: Hayes, M. (Ed.), **Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications**. Springer, p. 55–98, 2012.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A. A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Process Engineering**, v. 11, p. 279-308, 1987.

KALT, W.; JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B. Blueberries and human health: a review of current research. **Journal of the American Pomological Society**, v.61, p.151-160, 2007.

KECHINSKI, C. P. Estudo de diferentes formas de processamento do mirtilo visando à preservação dos compostos antociânicos. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

KING, A. M. Y.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KONG, J.-M.; CHIA, L.-S.; GOH, N.-K.; CHIA, T.-F.; BROUILLARD, R. Analusis and biological activities of anthocyanins**. Phytochemistry**, v. 64, p. 923-933, 2003.

KHALIFA, H. O., KAMIMOTO, M., SHIMAMOTO, T., & SHIMAMOTO, T. Antimicrobial effects of blueberry, raspberry and strawberry aqueous extract and their effects on virulence gene expression in Vibrio cholerae. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 1791–1797, 2015

KLUGE, R. A.; HOFFMANN, A.; BILHALVA, A. B. Comportamento de frutos de mirtilo (Vaccinium ashei Reade) cv. Powder Blue em armazenamento refrigerado. **Ciência Rural, Santa Maria,** v. 24, n. 2, p. 281-285, 1994.

LEE, J.; DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Impact of Juice Processing on Blueberry Anthocyanins and Polyphenolics: Comparison of Two Pretreatments. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1660-1667, 2002.

LEE, J.; DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment contento f fruits juices, beverages, natural colorants, and wines by de pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LEE, J; FINN, C. E.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigment and total phenolic content of three *Vaccinium* species native to the Pacific Northwest of North America. **HortScience**, v. 39, n. 5, p. 959-964, 2004.

LEE, J.; WROLSTAD, R. E. Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. **Journal of Food Science**, v. 69, n.7, p. 564-573, 2004.

LI, C.; FENG, J.; HUANG, W.Y.; AN, X.T. Composition of Polyphenols and Antioxidant Activity of Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 523-531, 2012.

LOPES, T.J.; XAVIER, M.F.; QUADRI, M.G.N.; QUADRI, M.B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.13, p.291-297, 2007.

LUTHRIA, D. L. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. **Food Chemistry**. v.107, p.745-752, 2008.

MACHADO, A.P.F. Extração de compostos bioativos do bagaço da amora-preta (*Rubus spp*.) utilizando líquidos pressurizados. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinhas, Campinas, 2014.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S.D. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25. p. 659-664, 2005.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Processamento de Alimentos (CEPPA): Curitiba**, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MANACH, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARÇO, P.H.; POPPI, R.J.; SCARMINIO, I.S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v.31, p. 1218-1223, 2008.

MARTÍNEZ, J. Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO2 supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Los flavonoides: propriedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1357-1367, 2007.

MONRAD, J. K.; HOWARD, L. R.; KING, J. W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58, p.2862-2868, 2010.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.

NARAYAN, M.S.; AKHILENDER NAIDU, K.; RAVISHANKAR, G.A., SRINIVAS, L.; VENKATARAMAN, L. V. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. **Prostagiandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, p. 1-4, 1999.

NAMIKI, M.; Antioxidants/antimutagens in food. **Food Science Nutrition**, v.29, p.273-300, 1990.

NAVARRO, D. F. Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies Allamanda blanchetti e Allamanda schottii Pohl para a obtenção de frações e moléculas bioativas de

potencial terapêutico. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NICOUÉ, E. É.; SAVARD, S.; BELKACEMI, K. Anthocyanins in Wild Blueberries of Quebec. Extraction and Identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5626-5635, 2007.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2004. Dissertação de mestrado. Escola superior de agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

OLIVEIRA, D. A. D. Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades merlot e syrah. 2010. **Dissertação de Mestrado.** Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PAES, J.; DOTTA, R.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Extraction of phenolics compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinum myrtillus* L.) resideus using supercritical CO2 and pressurized liquids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 8-16, 2014.

PAES, J. Concentração de compostos bioativos de resíduos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.) usando extração com CO_2 supercrítico e nanofiltração. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

PAULETTO, F. B. Extração e encapsulamento de pigmentos da casca de jabuticaba sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O, Berg.). **Dissertação de mestrado**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2016.

PEREIRA, G. I. S.; PEREIRA, R. G. F. A.; BARCELOS, M. F. P.; MORAIS, A. R. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 852-857, 2003.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZRUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GONO, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction measurement and expression of results. **Food Research International**. v.41, p. 274-285, 2008.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit waste. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006.

PIOVESAN, N. Influência de diferentes parâmetros em métodos de extração de compostos bioativos de mirtilo (Caccinium ashei Reade) e atividade antioxidante e antimicrobiana. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

PRONYK, C.; MAZZA, G. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. **Journal of Food Engineering**. v. 95, n. 2, p. 215-226, 2009.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMOS, L.; KRISTENSON, E. M.; BRINKMAN, U. A. T. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. **Journal of Chromatography**. v. 975, n. 1, p. 3-29, 2002.

RASEIRA, M.C.B; ANTUNES, L.E.C. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004.

RASEIRA, M.C.B.; ANTUNES, L.E.C. **Cultivo do mirtilo** (*Vaccinium* spp.). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006.

REVILLA, E.; RYAN, J-M.; MARTÍN-ORTEGA, G. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4592-4597, 1998.

REYES, A.; EVSEEV, A.; MAHN, A.; BUBNOVICH, V.; BUSTOS, R.; SCHEUERMANN, E. Effect of operating conditions in freeze-drying on the nutritional properties of blueberries. **International Journal Food Science Nutritional**, v. 62, p. 303-6, 2011.

ROCHA, J. C. G. Adição dos corantes naturais antocianinas e luteína em bebidas formuladas com proteínas de soro de leite. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

RODRIGUES, S. Á.; GULARTE, M. A.; PEREIRA, E. R. B.; BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Influência da cultivar nas características físicas, químicas e sensoriais de topping de mirtilo. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial,** v. 1, n. 1, 2007.

RODRIGUES, R.M.A., VÁZQUEZ ODERIZ, M.L., SIMAL-LOZANO, J. E LÓPEZ HERNÁNDEZ, J. Estudio de la composicion quimica de pequeños frutos, arandano, framboesa, groselha blanca, grosella negra, grosella roja y zarzamora producidos en Galicia. **Industria conserve,** v.67, p.29-33, 1992.

RODRIGUES, L. M. Obtenção de extratos com bixina a partir de semente de Urucum desengorduradas: estudos dos parâmetros de processo. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SANTOS, D.T.; VEGGI, P. C.; ANGELA, M.; MEIRELES, A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v.108, p.444–452, 2012.

SANTOS, A. M. DOS. Sistema de produção do mirtilo. **Embrapa Clima Temperado**, vol 8, 2007.

SARKIS, J. R.; JAESCHKE, D. P.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Effects of ohmic and conventional heating on anthocyanin degradation during the processing of blueberry pulp. **LWT – Food Science and Technology**, v. 51, p. 79-85, 2013.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia – Grow Bluberries and Blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 2432-2438, 2002.

SEVERO, J.; GALARÇA, S. P.; AIRES, R. F.; CANTILLANO, R. F. F.; ROMBALDI, C. V.; SILVA, J. A. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. **Brazilian Journal of Food Technology**, II SSA, p. 65-70, 2009.

SILVEIRA, N. G. A.; VARGAS, P. N.; ROSA, C. S. Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo highbusch. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 4, p. 365-370, 2008.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. **Em Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis; Food Phytochemicals for Cancer Prevention**: Washington, 1994.

SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS, 2003.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmaconosia: da planta ao medicamento**, 3 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/EDUSC, 2001.

SONG, W.; WANG, H. J.; BUCHELI, P.; ZHANG, P. F.; WEI, D. Z.; LU, Y. H. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from china. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 57, p. 9133-9140, 2009.

SOUSA, M. B.; CURADO, T.; LAVADINHO, C.; MOLDÃO-MARTINS, M. A survey of Quality Factors in Highbush and Rabbiteye Blueberry cultivars in Portugal. **Acta Horticulturae**. v.715, p.567-572, 2006.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plants food processing as a source of funcional compounds: recent developmentes. **Trends Food Science Technology**, v. 12, p. 401-413, 2001.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v.18, p.820–897, 2015.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E.; HEATHERBELL, D. A. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n. 7, p. 1572-1579, 1990.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation and detection methods for phenolics acids and flavonoids. **Jounal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

STRIK, B. Blueberry: an expanding world crop. **Chronica Horticulturae**, v.45, p.7-12, 2005.

TREHANE, J. **Blueberries, cranberries and other vacciniums**. Cambridge: Timber Press, 2004. 256p.

VASCONCELLOS, C. M. C. D. Extração supercrítica dos óleos voláteis de Achyrocline satureioides (Macela) e Vetiveria zizanioides (Vetiver): determinação da cinética de extração e estimativa de custos de manufatura. 2007. **Dissertação de Mestrado.** Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 6, p. 2118-24, 2005.

ZARDO, I. Extração e microencapsulação de compostos antociânicos do bagaço de mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.). **Dissertação se mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

WANG, S. Y.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacity anda-glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. **Food Chemistry**, n. 132, p. 1759-1768, 2012.

WIJNGAARD, H.; HOSSAIN, M.B.; RAI, D.K.; BRUTON, N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 505-513, 2012.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 53, p. 609-614, 2003.